

H25前期雑誌会宿題

SHG顕微鏡の再生医療への応用

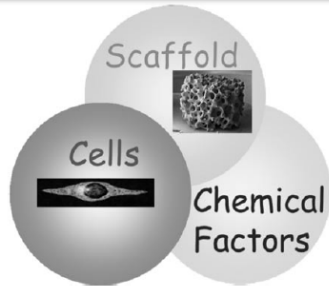
6/5 長谷

# 雑誌会宿題

- 細胞が硬さをどう感じるか
- SHG 顕微鏡が再生医療に応用され出したのはいつごろか
- 各手法の比較, 培養細胞の観点で特有の何かあるか
- Col I と Col V の構造について
- 格子ベクトルについてわかりやすく
- キトサン・MSC 培養システムの用途

# 細胞が硬さをどう感じるか

## 再生医用の製造工程



細胞が接着する足場が  
分化にとって重要

どの部位にあるのか？

- 1) 細胞接着部位 (焦点接着斑)
- 2) ストレスファイバ
- 3) 細胞膜のチャンネル, レセプタ

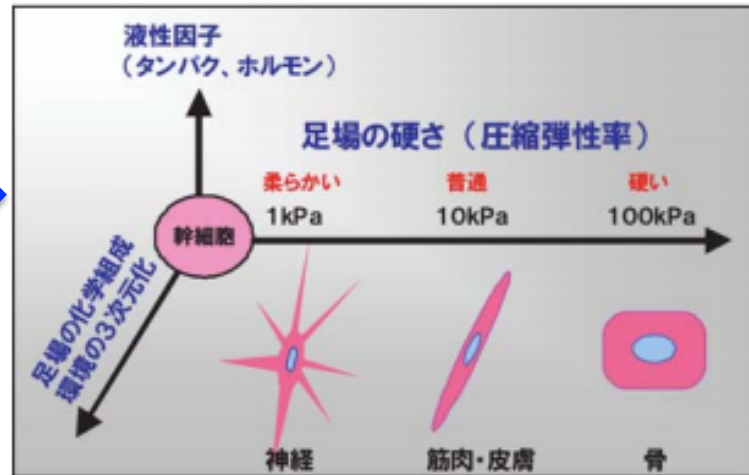
・焦点接着班

内部: 細胞骨格

外部: 細胞外マトリックス

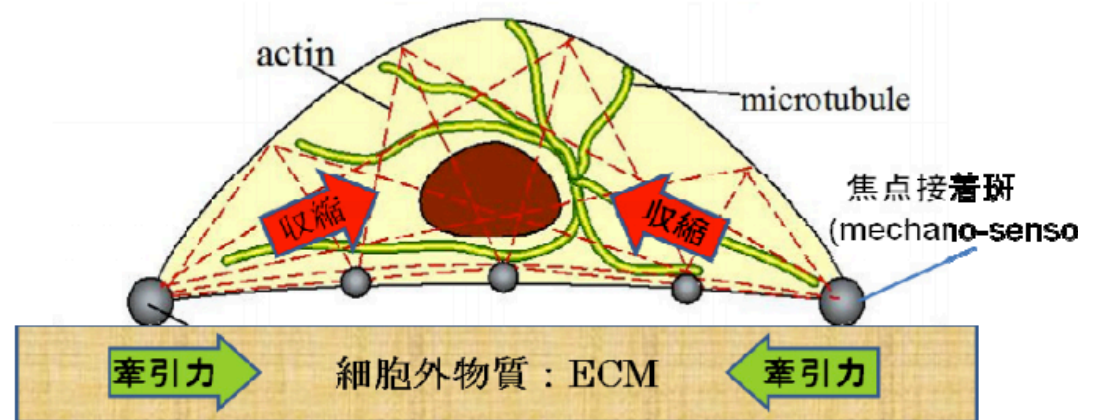
外力により細胞骨格や  
接着構造が変化

## 足場の硬さと分化誘導の関係



細胞

力覚  
(メカノセンサー)  
を持つ



# SHG 顕微鏡が再生医療に応用され出したのはいつごろか

## レーザー顕微鏡の歴史

- 1957 共焦点レーザー顕微鏡(M.Minsky): 論文は無く、特許のみ取得)
- 1974 第2高調波発生顕微鏡(R.Hellwarth): 最初の非線形顕微鏡
- 1982 コヒーレント反ストークスラマン散乱顕微鏡(M.D.Duncan)
- 1990 **2光子励起蛍光顕微鏡(W.Denk): バイオでよく用いられている**
- 1997 第3高調波発生顕微鏡(Y.Barad)
- 2006 誘導パラメトリック発光顕微鏡(K.Isobe): 現在まだ実用例は示せていない
- 2008 誘導ラマン散乱顕微鏡(C.W.Freudiger): ラマン散乱の高感度化

- 
- 2002 Zoumiらが2光子+SHGを組み合わせるにより細胞-細胞外マトリックスの相互作用を観察
  - 2006 **Leeらが再生医療に応用 → 足場(PGA)からの多光子蛍光と幹細胞から分化した骨芽細胞から産生する細胞外マトリックスからのSHGを観察**

# 各手法の比較, 培養細胞の観点で特有の何かあるか

## 従来法

- ・位相差顕微鏡が広く使われている
- ・ヒストロジー

## 求められるもの

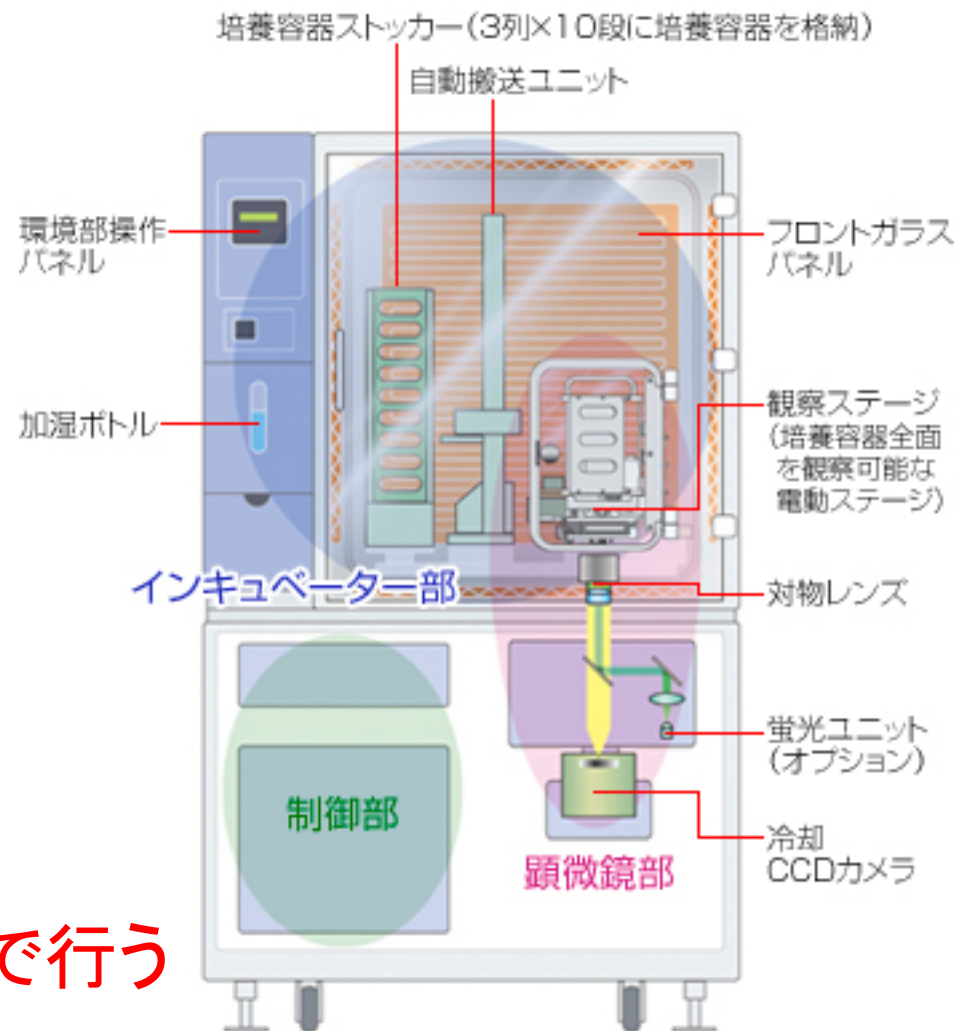
- ・非破壊
- ・非染色
- ・3D

## 装置構成

- ・環境変化, 容器の揺れによる細胞へのストレスを低減
- ・観察位置の再現性

培養から観察までを  
安定した環境で行う

Nicon社 細胞培養観察装置



# Col I と Col V の構造について

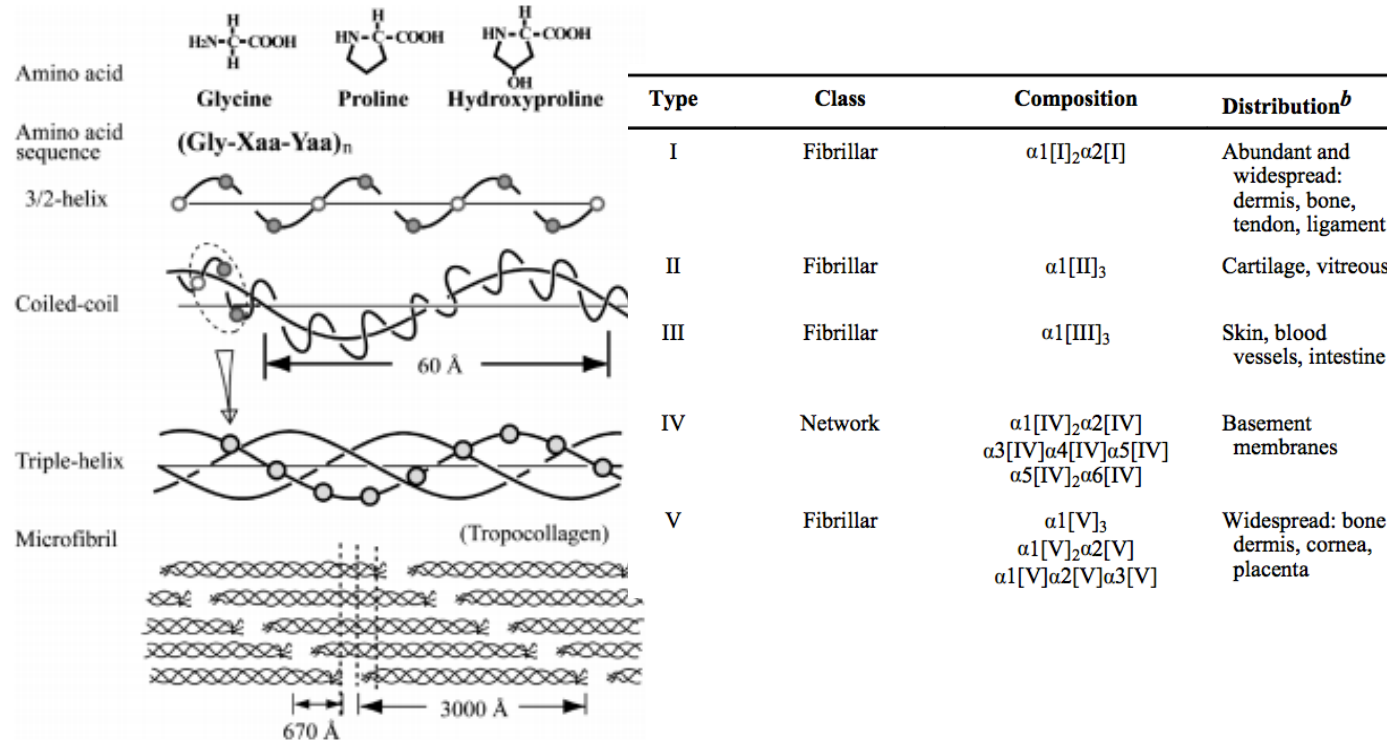


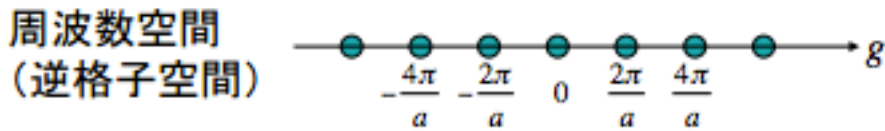
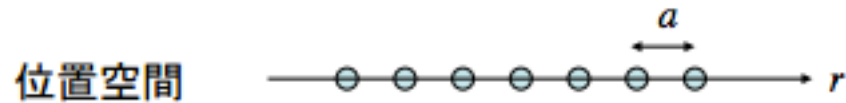
表2 ウシコラーゲンα鎖のアミノ酸組成

アミノ酸	1000残基当たりの残基数			
	$\alpha 1(\text{I})^{\text{a}}$	$\alpha 2^{\text{b}}$	$\alpha 1(\text{II})^{\text{c}}$	$\alpha 1(\text{III})^{\text{d}}$
3-ヒドロキシプロリン	1	-	2	
4-ヒドロキシプロリン	85	85	91	127
アスパラギン酸	45	47	43	48
トレオニン	16	17	22	14
セリン	34	24	26	44
グルタミン酸	77	71	87	71
プロリン	135	120	129	106
グリシン	327	328	333	366
アラニン	120	101	102	82
システイン	-	-	-	2
バリン	18	34	17	12
メチオニン	7	4	11	7
イソロイシン	9	17	9	11
ロイシン	21	34	26	15
チロシン	4	3	1	3
フェニルアラニン	12	16	14	9
ヒドロキシリジン	5	11	23	7
リジン	32	21	15	25
ヒスチジン	3	8	2	8
アルギニン	50	57	51	44

## α鎖の共通点

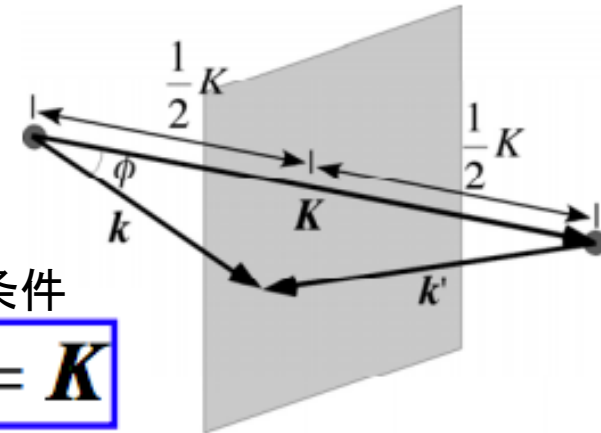
- (1) 分子中央には約1,000残基のアミノ酸からなるらせん領域
- (2) その両端に10~30残基程度の非らせん領域
- (3) らせん領域ではグリシン(Gly)が必ず3残基ごとにある  
Gly-Xaa-Yaa 配列が約330回以上繰り返す

# 格子ベクトルについてわかりやすく



入射波と散乱波の波数ベクトルの差が  
格子ベクトルに等しい時に強め合う

格子ベクトル  $K = 2\pi/a$



ラウエの条件

$$k - k' = K$$

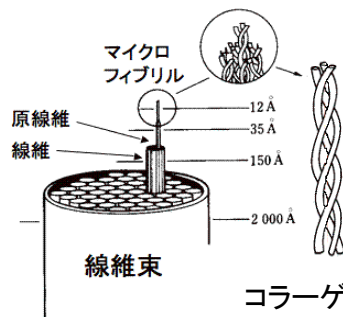
散乱したX線が干渉して強め合う条件

## コラーゲンからの $F_{SHG}$ vs $B_{SHG}$

### ☆ 擬似位相整合

媒質を伝搬する波数  $k$  の波 → 回折により  $K$  変化

位相整合条件は  $\Delta k + K = 0$



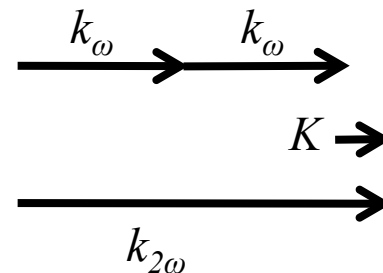
コラーゲン → 規則正しい配列  
格子ベクトル  $K$  が影響する

☆ 擬似位相整合条件が適用

コラーゲン分子

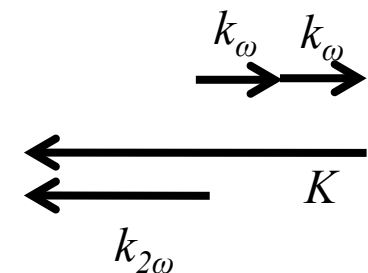
### Forward SHG

$$\Delta k_f = K - (k_{2\omega} - 2k_\omega)$$

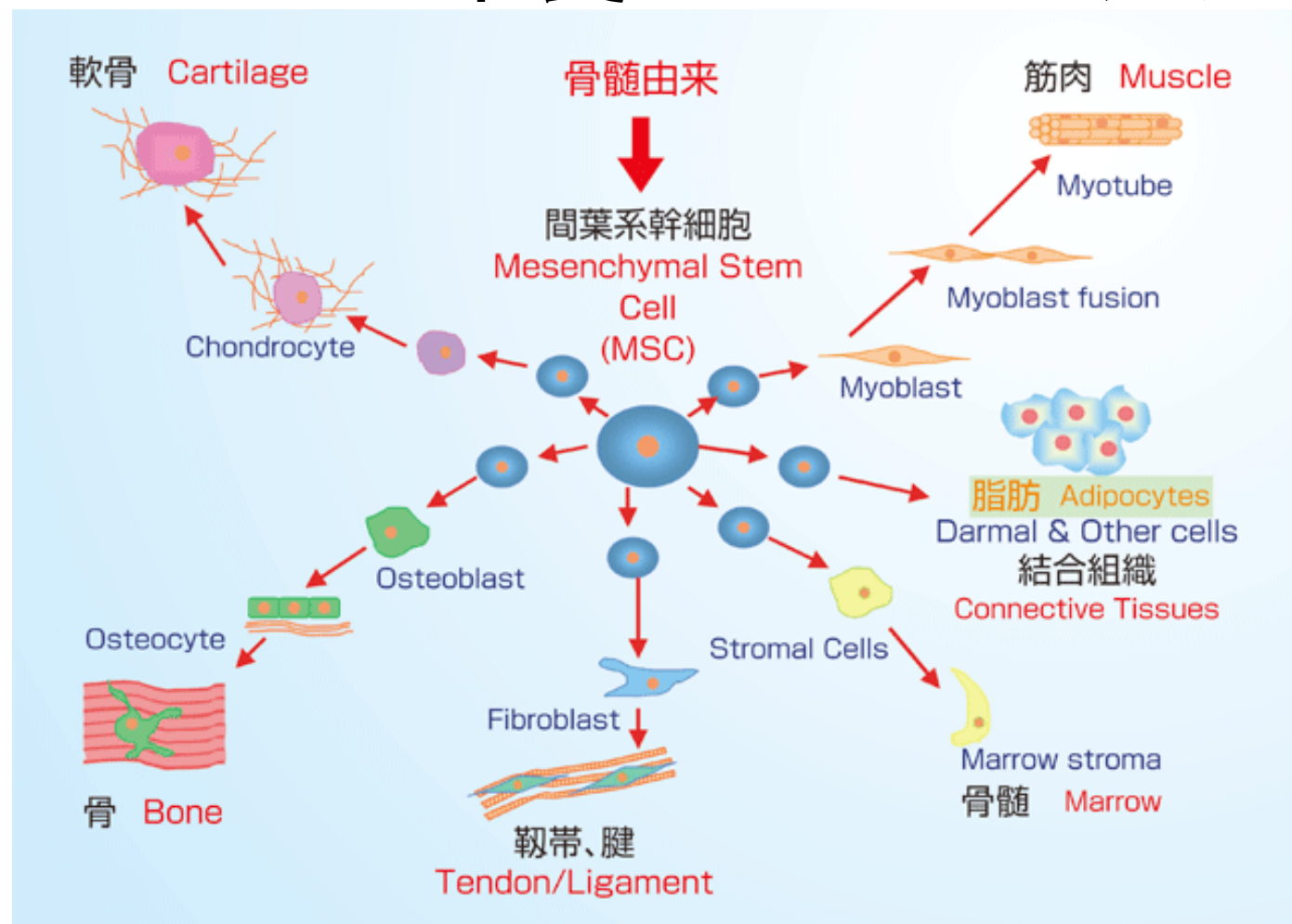


### Backward SHG

$$\Delta k_b = K - (k_{2\omega} + 2k_\omega)$$



# キトサン・MSC 培養システムの用途



キトサン・・・生体由来, 細胞接着性良, 弾力性良, ハイドロキシアパタイト構造を形成可能

**整形, 歯科用材料として利用化と考えられている**